Aus der II. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin
im Städtischen Krankenhaus Westend
Direktor: Professor Dr. med. Gotthard Schettler

Untersuchungen über die Fibrinolyse mit immunologischen Methoden

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jürgen Krüger
aus Nordhausen/Harz

1963

Aus der II. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin
im Städtischen Krankenhaus Westend
Direktor: Professor Dr. med. Gotthard Schettler

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE FIBRINOLYSE MIT IMMUNOLOGISCHEN METHODEN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jürgen Krüger
aus Nordhausen/Harz

Dekan: Professor Dr. med. Hugo Gasteiger

Referent: Professor Dr. med. Gotthard Schettler

Korreferent: Privat Doz. Dr. med. Hans-Joachim Dulce

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 6. 11. 1963

INHALT

	Seite
I. Einleitung	5
II. Methodischer Teil	8
Präparate und Lösungen	8
Methoden	8
III. Ergebnisse	12
A. Reinigung und Testung der Antifibrinogenseren	12
B. Immunchemische Untersuchungen der Fibrinogen- und Fibrinspaltprodukte	16
C. Die Bestimmung in vivo gebildeter fibrinolytischer Spaltprodukte	19
D. Nachweis der fibrinolytischen Spaltprodukte durch die Thrombinzeitbestimmung und Empfindlichkeitsvergleich mit der immunologischen Methode	22
IV. Besprechung	24
V. Zusammenfassung	28
VI. Literaturverzeichnis	30

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548012_0031

I. Einleitung

Die Auflösung des bei der Blutgerinnung gebildeten Fibrins obliegt einem besonderen proteolytischen Ferment, das als Fibrinolysin oder neuerdings als Plasmin bezeichnet wird, da es nicht nur Fibrinogen und Fibrin sondern auch andere Plasmaproteine angreift. Aus seiner im Plasma enthaltenen Vorstufe, dem Profibrinolysin oder Plasminogen, wird das Enzym durch einen Aktivator freigesetzt, der seinerseits durch verschiedene Kinasen aktiviert werden kann. Im Blut wirken dem Plasmin mehrere starke Inhibitoren entgegen, die eine schrankenlose Proteolyse verhindern. Plasmin spaltet Fibrin und Fibrinogen in lösliche, aber mit Trichloressigsäure größtenteils noch fällbare Polypeptide, die nicht mehr gerinnen können (SEEGERS, NIEFT und VANDERBELT 1945, KAPLAN 1954). Nach neuesten Untersuchungen von NUSSENZWEIG und Mitarb. (1961) sind im Fibrinogenlysat nach 7stündiger Plasmineinwirkung fünf verschiedene Fraktionen nachzuweisen. Die Hauptkomponente, die etwa 50% des gesamten Materials ausmacht, hat die elektrophoretische Beweglichkeit eines $beta_2$-Globulins, ein Molekulargewicht von 83 000 und ist thermolabil. Die zweitstärkste Fraktion wandert elektrophoretisch wie ein schnelles alpha-Globulin, besitzt ein Molekulargewicht von etwa 35 000 und verhält sich thermostabil. Die restlichen drei Spaltprodukte sind nur in geringen Konzentrationen vorhanden, haben kleinere Molekulargewichte und sind ebenfalls thermostabil.

Die Aufgabe des fribrinolytischen Systems besteht darin, lokale Fibringerinnsel in Blutgefäßen, Wunden oder an Entzündungsherden zu beseitigen. Neuerdings wird seine Funktion noch weiter gefaßt. Man stellt sich vor, daß im strömenden Blut normalerweise eine unterschwellige Gerinnung abläuft, die an der Intimaoberfläche zur Ausbildung eines für die Gefäßabdichtung notwendigen Fibrinfilmes führt. Als Gegenreaktion wird eine ebenfalls kontinuierliche Fibrinolyse angenommen, die so

abgestuft ist, daß der Fibrinfilm erhalten bleibt, die intravasale Gerinnung jedoch nicht erfolgen kann. Gerinnungsprozeß und Fibrinolyse stehen nach dieser Theorie in einem dynamischen Gleichgewicht, das die Integrität der Gefäßwand und das Flüssigbleiben des Blutes gewährleistet. Viele klinische und experimentelle Befunde stimmen mit dieser Hypothese überein, andere hingegen scheinen ihr zu widersprechen. Das Für und Wider wurde kürzlich von HJORT und HASSELBACK (1961) in einer zusammenfassenden Darstellung eingehend erörtert. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, daß die Theorie der kontinuierlichen Hämostase am intakten Endothel gegenwärtig weder als erwiesen gelten, noch abgelehnt werden kann. So erscheint es notwendig, weitere Untersuchungen über diese Frage anzustellen. Ein entscheidendes Argument für die Annahme einer permanenten in vivo-Fibrinolyse wäre der Nachweis von Fibrinabbauprodukten im normalen Blut. Die methodischen Voraussetzungen dazu haben SELIGMANN (1958), SALMON (1959) sowie SCHULTZE und SCHWICK (1957 und 1958) geschaffen, indem sie mit modernen immunchemischen Verfahren zeigen konnten, daß die hochmolekularen Lysederivate des Fibrinogens und Fibrins mit Antifibrinogenseren spezifisch präzipitieren. Den genannten Autoren gelang es auch, in normalen Seren kleine Spaltproduktmengen nachzuweisen; sie haben es allerdings unterlassen, nach der Blutentnahme die Fibrinolyse zu hemmen, so daß die gefundenen Spaltprodukte durchaus in vitro entstanden sein könnten.

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, durch die Berücksichtigung dieser Fehlerquelle einwandfrei festzustellen, ob im Normalblut mit immunchemischer Technik in vivo gebildete Abbauprodukte des Fibrinogens oder Fibrins zu erfassen sind. Die Untersuchungen wurden an 20 gesunden Personen im Alter zwischen 18 und 65 Jahren vorgenommen. Zur Ausschaltung der störenden in vitro-Fibrinolyse wurden dem Blut bei der Entnahme sofort Fibrinolysehemmstoffe zugesetzt. Als solche dienten epsilon-Aminocapronsäure, deren antifibrinolytische Wirkung ALKJAERSIG und Mitarbeiter (1959) eingehend analysiert haben

und Trasylol, dessen plasminhemmender Effekt von MARX und Mitarb. (1959) sowie von STREICHELE und HERSCHLEIN (1961) beschrieben wurde.

In weiteren Untersuchungen wurde geprüft, ob sich diese Methode zur Diagnostik pathologischer fibrinolytischer Prozesse eignet, wie sie z.B. nach Operationen, bei Schwangerschaftskomplikationen, Carcinomen und Lebercirrhosen auftreten können, da die bisherigen Nachweismöglichkeiten vor allem bei geringeren Graden intravasaler Proteolyse nicht befriedigen. Zu diesen Studien wurden 3 Patienten, bei denen aus therapeutischen Gründen durch Streptokinaseinfusionen eine Fibrinolyse ausgelöst worden war, sowie ein Patient mit Spontanfibrinolyse bei metastasierendem Prostatacarcinom herangezogen. Der Ablauf der fibrinolytischen Reaktion ist bei der therapeutisch induzierten Fibrinolyse besonders gut zu verfolgen. Es kommt zu einem raschen Abfall der Fibrinogenkonzentration und zu einer Gerinnungsstörung, die sich in einer Verlängerung der sog. Thrombinzeit äußert. Die Ursache der Gerinnungsstörung sind die hochmolekularen Spaltprodukte des Fibrinogens, denen NIEWIAROWSKI und KOWALSKI (1957 und 1958) eine Antithrombinwirkung zugeschrieben hatten. ALKJAERSIG, FLETCHER und SHERRY (1962) konnten aber zeigen, daß diese Substanzen nicht am Thrombin angreifen, sondern die Polymerisation der Fibrinmonomeren hemmen. Durch die Überwachung des Fibrinogenspiegels und der Thrombinzeit läßt sich die Fibrinolysetherapie in der Regel ausreichend steuern, so daß eine zusätzliche direkte Spaltproduktbestimmung nicht notwendig erscheint. Bei der Untersuchung einer Spontanfibrinolyse steht man dagegen vor der Schwierigkeit, die Ausgangslage nicht zu kennen, was die Bewertung der Fibrinogenkonzentration und der Thrombinzeit, insbesondere in weniger ausgeprägten Fällen, beeinträchtigt; hier könnte der immunologische Spaltproduktnachweis eine wichtige Ergänzung bilden. Es wurde deshalb nicht nur seine absolute Empfindlichkeit bestimmt, sondern auch ein Vergleich mit den Thrombinzeitwerten durchgeführt.

II. Methodischer Teil

Präparate und Lösungen

1. Fibrinogen: Human-Fibrinogen "Haemoderivate" (lyophilisiert), (Österreichisches Institut für Haemoderivate GmbH, Wien).

2. Plasmin: Fibrinolysin (Human) Lyovac, der Fa. Merck Sharp & Dohme, West Point, USA.

3. Streptokinase: Präparat Streptase der Behringwerke in Flaschen zu 5000 E Trockensubstanz (für Laborzwecke).

4. Thrombin: Reinpräparat der Deutschen Hoffmann- La Roche A. G. Grenzach i. Baden; 60 000 N. I. H. -Thrombineinheiten in 1 g.

5. Heparin: Präparat "Liquemin", in Ampullen zu 1 ml mit 2500 I. E. Heparin, der Hoffmann-La Roche A. G.

6. Epsilon-Aminocapronsäure: Präparat der Hoffmann-La Roche A. G., als 40%ige Lösung in Ampullen mit 5 ml abgefüllt.

7. Trasylol: Reines Trockenpräparat mit 1 Kallikrein-Inaktivator-Einheit in 0,3 Gamma, der Farbenfabriken Bayer. Die Auflösung erfolgte in 0,15 m NaCl-Lösung.

8. Pufferlösung für den Doppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY: 6,98 g Veronalnatrium; 6,0 g NaCl; 27,0 ml n/1 HCl gelöst zu 1 000 ml Aqua dest.; ph 7,4.

9. Pufferlösung für die Immunoelektrophorese: 20,6 g Veronalnatrium in 1 000 ml Aqua dest., davon 770 ml zu 230 ml n/10 HCl; ph 8,2.

10. Isotonisches Pufferbad: 10,3 g Veronalnatrium in 1 000 ml Aqua dest., davon 554 ml zu 446 ml n/20 HCl; ph 7,2. Zur Konservierung Zusatz von Cialit 1:5 000.

11. Antifibrinogenserum der Behringwerke: abgefüllt in Ampullen zu 0,5 ml, Operationsnummern 183, 268, 268A, 292 und 333.

Methoden

Herstellung von Antifibrinogenseren

Männliche Kaninchen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 3,5 kg wurden mit 500mg%iger Fibrinogenlösung nach folgendem Schema immunisiert:

1. Tag 1 ml Fibrinogenlösung intravenös (Ohrvene),
2. Tag 2 ml Fibrinogenlösung intravenös (Ohrvene),
3. Tag 3 ml Fibrinogenlösung intravenös (Ohrvene),
21. Tag 5 ml Fibrinogenlösung intraperitoneal.

Am 8. Tag nach der letzten Injektion wurden die Tiere in Evipannarkose teils durch Herzpunktion, teils durch Einführung eines Katheters in die freigelegte Aorta abdominalis entblutet. Das Blut wurde in großen Zentrifugengläsern aufgefangen und zur Retraktion des Blutkuchens über Nacht im Eisschrank belassen. Dann wurde 30 Min. bei 3 000 U/Min. zentrifugiert. Die Konservierung des Rohserums erfolgte entweder mit Cialit 1 : 5 000 oder mit 5 %iger Phenollösung in 0,9%iger NaCl-Lösung im Verhältnis 1 : 10. Einige der Seren wurden zwecks Erzielung eines höheren Antikörpertiters durch Ultrafiltration (Gerät der Membranfilter-Gesellschaft Göttingen) auf Konzentrationen um 13g% gebracht.

Doppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY (1958).

Saubere Glasplatten (14 x 5 cm) wurden in einer Schale mit der aufgekochten 1%igen Agarlösung, die den angegebenen Puffer enthielt, übergossen, so daß eine Schichtdicke von 3mm entstand. Nach dem Erstarren des Agars wurden die Platten in eine feuchte Kammer gelegt und bis zu 24 Stunden im Eisschrank aufbewahrt. Für den Test wurden in den Agar in kreisförmiger Anordnung Löcher von 4 mm Durchmesser gestanzt, die von dem in der Mitte des Kreises gestanzten Loch in der Regel einen Abstand von 4 mm hatten. In der Mitte wurde das Antiserum, in der Peripherie die Antigenlösung aufgetragen; die in die Löcher gefüllte Menge betrug zwischen 0,02 und 0,03 ml. Die Ablesung des Testes und die photographische Dokumentation erfolgte nach 24 Stunden in derselben Weise, wie unten für die Immunoelektropherogramme angegeben.

Immunoelektrophorese nach GRABAR und WILLIAMS (1953).

Verwendet wurde eine Apparatur der Fa. Marggraf, Berlin, in der nebeneinander 5 Glasplatten (14 x 5 cm) angesetzt werden können. Die Schichtdicke des 1%igen Elektrophoreseagars betrug 3 mm. Während die Elektrodengefäße mit unverdünnter Pufferlösung gefüllt wurden, erfolgte die Zubereitung der Agarlösung mit einem auf die Hälfte mit Aqua dest. verdünnten Puffer. Die Antigenlösungen wurden zu beiden Seiten des in der Mitte vorgestanzten Grabens in Löchern von 4 mm Durchmesser aufgetragen und danach elektrophoretisch getrennt. Die Dauer des Stromdurchganges richtete sich nach der Art des Materials. Im allgemeinen wurde mit einer Stromstärke von 100 mA und einer Feldstärke von 4-5 Volt/cm gearbeitet. Nach der Elektrophorese wurden die Platten genau 30 Min. in das isotonische Pufferbad gelegt und im Anschluß daran in den Gräben mit Antiserum beschickt. Die Ablesung erfolgte nach 1 bis 3 Tagen. Zur Photographie wurde ein Leitz-Focomat IIa mit dem Objektiv Focotar f=9,5 cm, 1:4,5 verwendet. Von verschiedenen Papiersorten ergab das Papier Lupex extra hart die besten Abbildungen. Als Entwickler dienten Tepa bzw. Eukobrom.

Quantitative optische Bestimmung der Immunpräzipitate nach SCHULTZE und SCHWICK (1958).

Die Trübungsmessungen wurden in Mikroküvetten für 1,0 ml Inhalt mit dem Zeiss-Opton-Spektralphotometer PMQ II bei der Wellenlänge 450 mμ durchgeführt. In den Mikroküvetten wurden 0,6 ml verdünnten Antiserums mit 0,06 ml der Antigenlösung gemischt. Die Ablesung erfolgte nach 15 Min. Inkubation bei Zimmertemperatur. Um eine Eichkurve zu erhalten, wurden bei konstanter Antiserumverdünnung verschiedene Antigenverdünnungen gemessen. Als Bezugskurve diente der ansteigende Ast dieser Eichkurve. Wenn Antiseren verwendet wurden, die erst kurz zuvor mit frischen Normalseren erschöpft worden waren, erhielten sie einen Zusatz von 500 E Heparin/ml, um eine Gerinnung in dem Ansatz zu verhindern.

Fibrinogenbestimmung nach Wycoff (1956)

Die Methode wurde dahingehend modifiziert, daß an Stelle einer 10 mg%igen eine 100 mg%ige Thrombinlösung verwendet wurde, um in Proben aus Spaltungsansätzen eine schnellere Gerinnung zu erreichen. 0,1 ml Plasma bzw. Fibrinogenlösung wurden mit 1 ml Thrombin-Alkohollösung versetzt, zum Aufwickeln der Gerinnsel dienten mit Flußsäure aufgerauhte Schmelzpunktröhrchen.

Gewinnung von Fibrinogen- und Fibrinspaltprodukten

Fibrinogenolyse: 1 ml 300 mg%ige Fibrinogenlösung wurde mit 0,1 ml Streptase (= 1 000 Einheiten) versetzt und 1 Stunde bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Schon nach wenigen Minuten war in diesem Ansatz kein gerinnbares Fibrinogen mehr nachzuweisen.

Fibrinolyse: 1 ml 300 mg%ige Fibrinogenlösung wurde mit 0,1 ml Streptase (= 1 000 Einheiten) und sofort danach mit 0,1 ml Thrombinlösung (= 12 Einheiten) versetzt; darauf bildete sich nach wenigen Sekunden ein Gerinnsel, das sich bei Inkubation im Wasserbad von 37° C nach etwa 5 Minuten auflöste. Die Inkubationszeit betrug wie bei der Fibrinogenolyse 1 Stunde.

Plasmafibrinolyse: es wurde in derselben Weise wie bei der Fibrinolyse verfahren, nur wurde an Stelle der Fibrinogenlösung Citratplasma (1 Teil 3,8 %ige Citratlösung zu 9 Teilen Blut) verwendet. Die Lyse des Fibrinogenpräparates war mit Streptokinase möglich, da es Plasminogenbeimengungen enthielt.

Thrombinzeitbestimmung nach JÜRGENS (1952).

Die Durchführung erfolgte gemäß der Originalvorschrift. Die Thrombinlösung wurde so eingestellt, daß die Normalwerte etwa bei 20 Sekunden lagen.

Gesamteiweißbestimmung.

Der Eiweißgehalt der Antiseren wurde bestimmt, um die mittels Ultrafiltration vorgenommene Aufkonzentrierung messen zu können. Es wurde die übliche Biuret-Methode mit dem Reagenz nach WEICHSELBAUM angewandt.

Bestimmung der fibrinolytischen Spaltprodukte im Blut.

a) Serumgewinnung mit epsilon-Aminocapronsäure: in eine 2 ml-Spritze wurden 0,7 ml der 40 %igen sterilen epsilon-Aminocapronsäurelösung und dazu nach Einstich in die Vene 1,3 ml Blut aufgezogen. Der Inhalt der Spritze wurde dann in ein mit 0,05 ml Thrombinlösung (= 18 Einheiten) beschicktes Röhrchen gegeben und zur Gerinnung bei Zimmertemperatur belassen. Nach der Gerinnung wurde das Serum durch 15 Min. Zentrifugieren bei 5 000 U/min abgetrennt und in geometrischer Verdünnungsreihe auf OUCHTERLONY-Platten gegen Antifibrinogenserum aufgetragen. Der Zusatz von epsilon-Aminocapronsäure bewirkte häufig eine geringe Hämolyse, die jedoch die Immunpräzipitation nicht beeinträchtigte.

b) Serumgewinnung mit Trasylol: dazu wurden in die 2 ml Spritze 0,2 ml einer Trasylollösung (6 000 K.I.E/ml) gefüllt und Venenblut bis zur Marke 2,0 aufgezogen. Auf die Zugabe von Thrombin konnte verzichtet werden, weil die Blutgerinnung nicht erheblich verzögert war. Nach dem Gerinnen wurde das Blut 10 Min. bei 3 000 U/Min. zentrifugiert und das Serum zur immunologischen Untersuchung entnommen, die entweder im Doppeldiffusionstest oder im optischen Test erfolgte.

III. Ergebnisse

Reinigung und Testung der Antifibrinogenseren.

Die von den Kaninchen gewonnenen Rohseren wurden zunächst auf ihr Antikörperspektrum untersucht. Dabei fanden sich nicht nur Antikörper gegen Fibrinogen, sondern auch gegen andere Plasmaproteine. So läßt das Immunoelektropherogramm in Abb. 1 neben der Fibrinogenbande des Plasmas, sowohl im Plasma wie im Serum je 3 Präzipitatlinien erkennen, die Globulinen des $beta_1$- und $beta_2$- Bereiches zuzuordnen sind. Von diesen Globulinen ist das zur Immunisierung verwendete Fibrinogenpräparat offenbar nicht vollständig befreit gewesen.

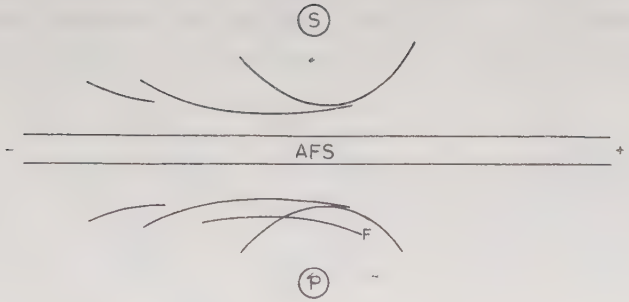


Abb. 1 Immunoelektropherogramm von Plasma (P) und Serum (S), entwickelt mit Antifibrinogenrohserum (AFS) Nr. 324. Trennung 4 Stunden bei 4,5 V/cm. F: Fibrinogenbande

Um die nicht gegen Fibrinogen gerichteten Antikörper zu entfernen, wurde das Antiserum mit frischem, unter Trasylolschutz gewonnenem Humanserum absorbiert. Danach stellte sich, wie die Abb. 2 zeigt, immunoelektrophoretisch nur noch die Fibrinogenbande des Plasmas dar,

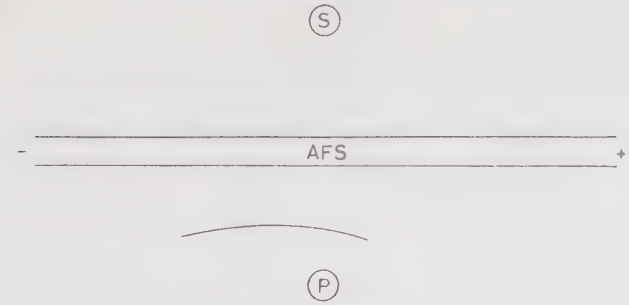


Abb. 2 Immunoelektropherogramm von Plasma (P) und Serum (S), entwickelt mit monospezifischem AFS Nr. 324. Trennung 4 Stunden bei 4,5 V/cm.

während im Serum keine Präzipitation mehr auftrat. Der Übergang vom multi- zum monovalenten Antiserum wurde auch mit dem Doppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY kontrolliert. In Abb. 3 sind die Befunde

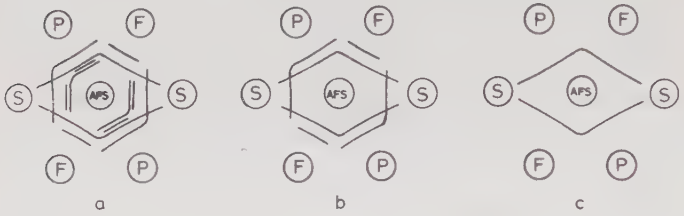


Abb.3 Kontrolle der schrittweisen Erschöpfung von nichtfibrinogenspezifischen Antikörpern des AFS Nr. 324 im Ouchterlony-Test.
a: Antifibrinogenrohserum; b: AFS nach einmaliger Absorption mit Humanserum; c: AFS nach dreimaliger Absorption.
F: Fibrinogen; P: Plasma; S: Serum.

bei stufenweiser Absorption wiedergegeben. Das Rohserum ergab gegenüber Plasma und Serum mehrere parallel verlaufende Präzipitatlinien und auch mit dem Fibrinogenpräparat eine spezifische und eine unspezifische Bande. Nach der ersten Absorption erschien im Plasma außer der Fibrinogenlinie nur noch eine Bande, die auch im Serum auftrat und die benachbarte Fibrinogenlinie kreuzte. Nach nochmaliger Absorption war das Antiserum monospezifisch für Fibrinogen und reagierte mit dem Serum nicht mehr. Bei einigen der Antiseren war eine mehrmalige Absorption mit Serum nötig, um den letzten nicht fibrinogenspezifischen Antikörper zu entfernen; offenbar ist das entsprechende Antigen im Serum nur in geringer Konzentration vorhanden. Stets war ein deutliches Kreuzungsphänomen dieser unspezifischen Bande mit der Fibrinogenlinie zu erkennen, so daß es sich zweifellos nicht um ein präzipitiertes Fibrinogenderivat gehandelt hat.

Auch die von den Behringwerken bezogenen Antifibrinogenseren bedurften - abgesehen von einer Charge - der Reinigung durch z.T. wiederholte Nachabsorption mit Normalserum, da sie einen nicht fibrinogenspezifischen Antikörper, der ein alpha$_2$-Globulin präzipitierte, enthielten. Die Abb. 4 zeigt diese unspezifische Bande im Serum und Plasma, darge-

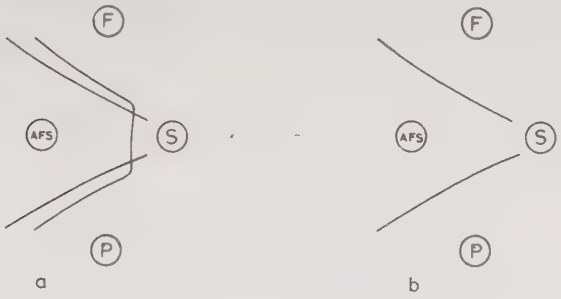


Abb.4 Antifibrinogenserum (AFS) vor (a) und nach (b) Absorption des nicht fibrinogenspezifischen Antikörpers. F: Fibrinogen; P: Plasma; S: Serum.

stellt mit dem Antifibrinogenserum der Behringwerke (Op. Nr. 333); daneben erkennt man die Ausschaltung des Antikörpers nach zweimaliger Absorption mit Humanserum.

Die Stärke der Antifibrinogenseren wurde im OUCHTERLONY-Test gegen eine in geometrischer Reihe verdünnte Fibrinogenlösung ermittelt. Die besten Antiseren ergaben noch mit einer 2 mg%igen Fibrinogenlösung eine deutliche Präzipitatlinie; da nur 0,02 ml dieser Lösung zu Diffusion aufgetragen wurden, betrug somit die kleinste nachweisbare Absolutmenge des Fibrinogens 0,4 Gamma. Bei der optischen Messung der Antigen-Antikörperreaktion nach dem Verfahren von SCHULTZE und SCHWICK (1958) lag die Nachweisgrenze bei einer Absolutmenge von etwa 1,2 Gamma Fibrinogen. Die in Abb. 5 dargestellte Trübungskurve (Kurve 1) zeigt den typischen Verlauf; zunächst nimmt die Trübung mit

der Antigenkonzentration zu, sinkt dann aber ab, entsprechend der bekannten Tatsache, daß die Immunpräzipitate im Antigenüberschuß in zunehmendem Maße löslich werden.

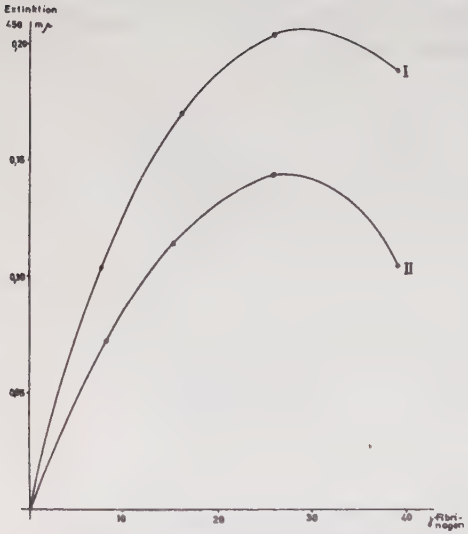


Abb. 5 Vergleich der quantitativen Immunpräzipitatsbestimmung von Fibrinogen (I) und Fibrinogenlysat (II)

Immunchemische Untersuchungen der Fibrinogen- und Fibrinspaltprodukte.

Die immunchemischen Eigenschaften der durch Plasmineinwirkung gebildeten Fibrinogen- und Fibrinspaltprodukte zeigen sich am deutlichsten bei der immunoelektrophoretischen Untersuchung. Wie die Abb. 6 erkennen läßt, treten nach der Lyse an Stelle der einheitlichen Fibrinogenbande zwei Präzipitatlinien auf, die sich an ihrer Berührungsstelle überkreuzen. Während die Fibrinogenbande in Höhe der Auftragungsstelle erscheint, liegt eine Spaltproduktbande anodenwärts, die andere kathodenwärts davon. Die Spaltproduktlinien erscheinen außerdem deutlich gestreckter als die Fibrinogenbande. Dieses immunoelektro-

phoretische Bild kann nur so gedeutet werden, daß sich unter den Abbauprodukten des Fibrins zwei präzipitable Fraktionen mit unterschied-

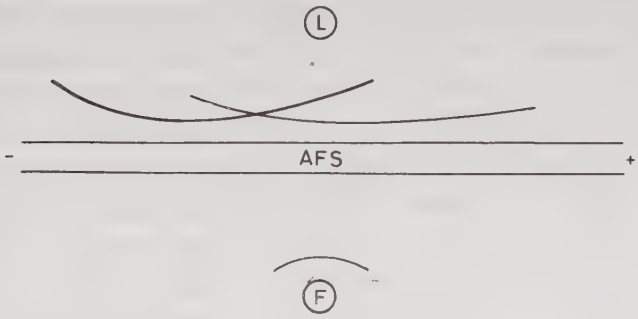


Abb. 6 Immunoelektropherogramm von Fibrinogen (F) und Fibrinogenlysat (L), entwickelt mit monospezifischem Antifibrinogenserum (AFS). Trennung 2 Stunden bei 4,5V/cm

lichem Antigenmuster befinden und beweist zugleich, daß das monospezifische Antifibrinogenserum zweierlei Antikörper enthält, von denen jeder gegen ein anderes Antigen des Fibrinogenmoleküls gerichtet ist. Erst am gespaltenen Material wird also sichtbar, daß das Fibrin bzw. Fibrinogen nicht nur eine, sondern mehrere Antigendeterminanten besitzt. Nach Erhitzen des Lysats auf 56° war nur noch die anodisch wandernde Fraktion nachzuweisen, so daß es sich bei dieser um die Komponente E von NUSSENZWEIG und Mitarb. (1961) handeln dürfte, während die kathodisch wandernde Fraktion der Komponente D dieser Autoren gleichzusetzen ist. Bei der Untersuchung von Fibrinogenlysat und Fibrinlysat ergaben sich keine Unterschiede, aus beiden Molekülen gehen also immunchemisch identische Spaltprodukte hervor.

Mit dem Doppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY waren die Spaltprodukte ebenfalls gut nachzuweisen. Der Befund ist in Abb. 7 wiedergegeben. Das Antifibrinogenserum diffundierte gegen Fibrinlysat, Fibrinogen-

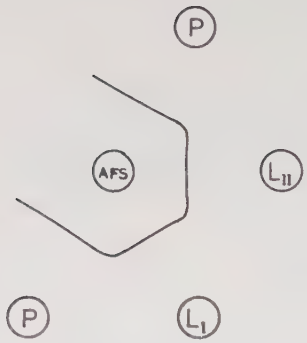


Abb. 7 Spaltprodüktnachweis im Ouchterlony-Test. P: Plasma, L_I: Fibrinogenlysat; L_{II}: Fibrinlysat

lysat und Plasma als Fibrinogenquelle. Man erkennt eine durchgehende Präzipitatlinie ohne Kreuzungsphänomene, also auch hier eine Übereinstimmung zwischen gespaltenem Fibrinogen und Fibrin. Es überrascht, daß gegenüber den Lysaten keine Doppelbanden auftreten, da sie nach den Ergebnissen der immunoelektrophoretischen Untersuchung zwei Komponenten mit unterschiedlichen Antigenen enthalten. Das Ausbleiben der Doppelbanden ist damit zu erklären, daß sich die Präzipitatlinien der beiden Spaltprodukte infolge ihrer etwa gleich großen Diffusionsgeschwindigkeiten genau überlagern. Dieser Überlagerungseffekt erklärt auch, daß die Lysate mit dem ungespaltenen Fibrinogen eine vollständige Identitätsreaktion ergeben. Für die quantitative Auswertung des Diffusionstestes wurde der Titer des Antifibrinogenserums gegen eine Fibrinogenlösung und das daraus gewonnene Lysat bestimmt. Dazu wurden beide Lösungen in geometrischer Verdünnungsreihe gegen das Antifibrinogenserum aufgetragen. Es zeigte sich, daß die Präzipitatlinien des Lysats in höheren Verdünnungen zwar etwas zarter als die des Fibrinogens ausfielen, der Endtiter stimmte jedoch überein. Er lag bei 2 mg% gespaltenem bzw. ungespaltenem Fibrinogen.

Genauere Resultate ließen sich durch die optische Messung der Antigen-Antikörperreaktion nach der Methode von SCHULTZE und SCHWICK (1958) erhalten. Abb. 5 zeigt die Trübungskurven, die mit einer Fibrinogenlösung und dem entsprechenden Lysat bei variierter Konzentration aufgenommen wurden. Man sieht, daß die Präzipitate des Lysats eine deutlich schwächere Extinktion ergeben, wofür wohl in erster Linie die geringere Molekülgröße der Spaltprodukte verantwortlich zu machen ist, denn ihre Molare Konzentration dürfte doch etwa der des Fibrinogens entsprechen. Wegen der gefundenen Differenz ist jedenfalls nur die Lysatkurve als Bezugskurve geeignet. Auch im optischen Test liegt die untere Nachweisgrenze bei einer Konzentration von etwa 2 mg% gespaltenem bzw. ungespaltenem Fibrinogen.

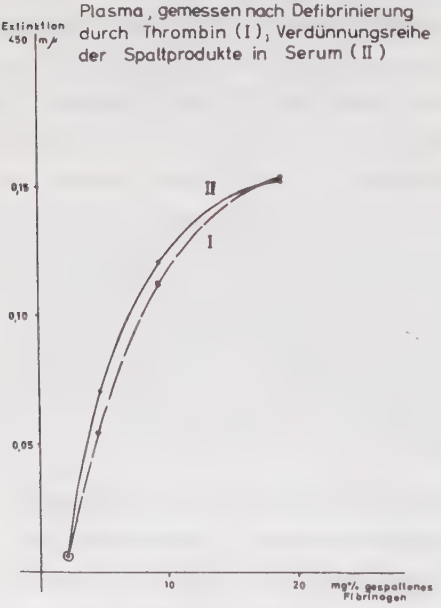
Die Bestimmung in vivo gebildeter fibrinolytischer Spaltprodukte.

Um die Methoden der Immunpräzipitation zur Messung der intravasalen Fibrinolyse heranziehen zu können, war es notwendig, bei der Blutentnahme sofort die Fibrinolyse zu blockieren. Dazu wurde zunächst epsilon-Aminocapronsäure in einer Konzentration von 1,4 mmol/ml Serum verwendet. Geringere Konzentrationen dieser Substanz hemmen nach ALKJAERSIG und Mitarb. (1959) nur die Plasminogenaktivierung, nicht aber das fertig gebildete Plasmin vollständig. Da die epsilon-Aminocapronsäure in dem gewählten Konzentrationsbereich zu einer beträchtlichen Gerinnungsverzögerung und zu einer leichten Hämolyse führt, wurde sie später durch Trasylol in einer Konzentration von 1 000 K.I.E. ersetzt. Das Trasylol besitzt keine unerwünschten Nebenwirkungen und läßt sich sehr bequem handhaben.

Durch besondere Ansätze wurde sichergestellt, daß die Fibrinolysehemmung mit beiden Methoden vollständig war. Als Plasminquelle diente aktiviertes Serum (zu 1 ml Serum 0,1 ml = 1 000 E Streptaselösung). Im ersten Versuch wurden 0,3 ml des aktivierten Serums

nacheinander mit 0,33 ml einer 40%igen epsilon-Aminocapronsäurelösung und 0,66 ml einer 1 000 mg%igen Fibrinogenlösung versetzt und der Ansatz mit 0,2 ml Thrombinlösung (= 12 Einheiten) zu Gerinnung gebracht; nach 1 stündiger Inkubation bei 37° wurde das Serum gewonnen und im OUCHTERLONY-Test auf Spaltprodukte untersucht. Im zweiten Versuch wurden zu 1 ml aktiviertem Serum 0,2 ml Trasylollösung (= 1 500 K.I.E.), 0,25 ml einer 1 000 mg%igen Fibrinogenlösung und 0,05 ml Thrombinlösung (= 12 Einheiten) gegeben und nach 1 stündiger Inkubation bei 37° das Serum gewonnen und wie oben auf Spaltprodukte getestet. In beiden Fällen traten gegen Antifibrinogenserum keine Präzipitatlinien auf, während sie sich in entsprechenden Kontrollansätzen ohne Inhibitoren deutlich zeigten.

Abb. 8 Untersuchung der Spaltproduktabsorption an das Fibringerinnsel. Verdünnungsreihe der Spaltprodukte in Plasma, gemessen nach Defibrinierung durch Thrombin (I), Verdünnungsreihe der Spaltprodukte in Serum (II)



Durch einen weiteren Vorversuch war zu klären, ob und in welchem Maße die Fibrinolyseprodukte durch das Blutgerinnsel adsorbiert werden, da sonst die Nachweisgrenze nicht zuverlässig angegeben werden konnte. Er wurde mit dem optischen Test durchgeführt und hatte das in Abb. 8 dargestellte Ergebnis. Die Trübungskurve 1 wurde mit einem mittels Thrombin defibrinierten Plasma (Fibrinogenkonzentration 150 mg%) aufgenommen, dem vor der Gerinnung die auf der Abszisse angegebenen

Spaltproduktkonzentrationen zugesetzt worden waren. Dieselben Lysatkonzentrationen im Serum ergaben die Bezugswerte in Kurve 2. An der weitgehenden Übereinstimmung beider Kurven läßt sich ablesen, daß eine signifikante Adsorption an das Fibringerinnsel auch im Bereich kleiner Spaltproduktkonzentrationen nicht stattgefunden hat.

Sodann wurde das Nüchternblut von 20 gesunden Versuchspersonen im Alter zwischen 18 und 65 Jahren auf seinen Gehalt an fibrinolytischen Spaltprodukten untersucht. 15 dieser Bestimmungen wurden mit dem Inhibitor epsilon-Aminocapronsäure, 5 mit Trasylol durchgeführt. In keinem Falle konnte in den normalen Seren mit der OUCHTERLONY-Technik die geringste Andeutung einer Präzipitatlinie beobachtet werden. Um die Nachweisgrenze zu erweitern, wurden 3 der Seren durch Ultrafiltration auf den doppelten Eiweißgehalt eingeengt, aber auch in diesen konzentrierten Seren trat keine Präzipitation in Erscheinung. Dagegen ergab das verwendete Antifibrinogenserum mit einer 2 mg%igen Fibrinogenlösung noch eine deutliche Präzipitatlinie. Dieses Ergebnis besagt, daß, wenn überhaupt, weniger als 1 - 2 mg% gespaltenes Fibrinogen im normalen Blutplasma enthalten sind.

Um die Brauchbarkeit des immunologischen Testes zur Erfassung pathologischer fibrinolytischer Prozesse zu erweisen, wurden im Anschluß an die Normalbestimmungen drei Patienten untersucht, die Streptokinaseinfusionen erhalten hatten. Bei zwei Patienten lag ein frischer Herzinfarkt vor. Die Spaltproduktbestimmung wurde durchgeführt, nachdem die Fibrinogenkonzentration unter einer Dosis von 500 000 Einheiten Streptase auf 45 bis 50 mg% abgefallen war. Zu diesem Zeitpunkt war der immunologische Test erwartungsgemäß stark positiv. Bei einem dritten Patienten, dem wegen eines akuten LERICHE-Syndroms 250 000 Einheiten Streptase infundiert wurden, sank unter dieser Behandlung der Fibrinogenspiegel von 260 auf 207 mg%. Bei ihm wurde die Spaltproduktbestimmung mit dem optischen Test quanti-

tativ durchgeführt und ergab einen Wert von 54 mg%, also genau den Betrag, um den die Fibrinogenkonzentration abgenommen hatte. Spaltprodukte waren auch im Serum eines 72jährigen Kranken mit schwer stillbarem Nasenbluten bei metastasierendem Prostatacarcinom nachzuweisen. Da die Fibrinogenkonzentration mit 228 mg% noch im normalen Bereich lag, war es in diesem Fall nur mit Hilfe des immunologischen Spaltproduktestes möglich, das Vorliegen einer Spontanfibrinolyse im strömenden Blut zu diagnostizieren.

Nachweis der fibrinolytischen Spaltprodukte durch die Thrombinzeitbestimmung und Empfindlichkeitsvergleich mit der immunologischen Methode.

In Gegenwart fibrinolytischer Spaltprodukte ist die Thrombingerinnungszeit des Plasmas verlängert. Wie ALKJAERSIG und Mitarb. (1962) kürzlich gezeigt haben, beruht dieser Effekt auf einer Hemmung der Fibrinpolymerisation durch den thermolabilen der beiden präzipitablen Lysatfaktoren. Es interessierte deshalb ein Vergleich der Empfindlichkeit des immunologischen Tests und der Thrombinzeit, zumal letztere neuerdings zur Überwachung der Streptokinasetherapie mit herangezogen wird.

Das Ergebnis der in vitro durchgeführten Untersuchungen ist in Tabelle 1 zusammengefaßt. Zur Gewinnung der Spaltprodukte wurde eine Fibrinogenlösung bekannter Konzentration durch Streptokinasezusatz zur Lyse gebracht und in geometrischer Reihe mit Veronalpuffer ph 7,4 verdünnt. Dann wurden je 0,1 ml Spaltproduktlösung nacheinander mit 0,1 ml Trasylollösung (= 1 000 K.I.E.) und 0,8 ml Plasma versetzt. In der ersten Versuchsreihe wurde unverdünntes Citratplasma verwendet, wobei sich in den Ansätzen eine Fibrinogenkonzentration von 152 mg% ergab. In der zweiten Versuchsreihe wurde die Fibrinogenkonzentration durch Verdünnung des Plasmas mit Veronalpuffer ph 7,4 auf 45 mg% eingestellt. Die Befunde zeigen eine deutliche Abhängigkeit der

gerinnungshemmenden Wirkung der Spaltprodukte von der Fibrinogenkonzentration. Bei einer Fibrinogenkonzentration von 152 mg% führen erst 62,8 mg% Spaltprodukte zu einer signifikanten Verlängerung der Thrombinzeit, während bei einer Fibrinogenkonzentration von 45 mg%

Spaltproduktkonzentration (in mg% gespaltenes Fibrinogen)	Thrombinzeit (Sec.)	
	Fibrinogenkonzentration 152 mg%	Fibrinogenkonzentration 45 mg%
62,8	27,5	34,8
31,4	25,8	31,8
15,7	25,0	26,2
7,9	24,0	26,0
3,95	24,2	26,5
1,98	24,2	26,2
0,99	23,5	26,5
-	23,2	26,5

Tabelle 1 Abhängigkeit der Thrombinzeit von der Spaltproduktkonzentration bei unterschiedlicher Fibrinogenkonzentration

bereits 31 mg% Spaltprodukte einen gesicherten Effekt haben. Ein Vergleich der Leerwerte läßt erkennen, daß die Thrombinzeit aber nicht nur von dem Verhältnis der Konzentrationen des gespaltenen und ungespaltenen Fibrinogens, sondern auch von der absoluten Fibrinogenkonzentration abhängt. Da die Thrombinzeit ferner von den Antithrombinen II, III und IV des Plasmas beeinflußt wird, kann eine Thrombinzeitverlängerung nicht ohne weiteres auf das Vorhandensein fibrinolytischer Abbauprodukte bezogen werden. Das ist nur möglich, wenn, wie z.B. bei der therapeutisch induzierten Fibrinolyse, die Ausgangswerte bekannt sind oder im Falle einer starken Fibrinolyse mit erheblich erhöhten Thrombinzeitwerten.

Demgegenüber besitzt der immunologische Test strenge Spezifität und darüber hinaus eine wesentlich größere Empfindlichkeit. Die Nachweis-

grenze der Spaltprodukte wurde in einem Parallelversuch mit der optischen Methode bei 2 bis 4 mg% gefunden. Da von dem Gerinnsel keine nennenswerten Spaltproduktmengen adsorbiert werden, ist diese Bestimmungsmethode außerdem von der Fibrinogenkonzentration unabhängig. Im Gegensatz zur Thrombinzeitbestimmung erscheint sie daher besonders zur Erfassung der weniger stark ausgeprägten fibrinolytischen Prozesse geeignet.

IV. Besprechung

Wie die vorstehenden Untersuchungen ergaben, sind in normalen, unter dem Schutz von Trasylol oder epsilon-Aminocapronsäure gewonnenen Seren mittels Immunpräzipitation keine fibrinolytischen Spaltprodukte nachzuweisen. Daraus läßt sich allerdings ein vollständiges Fehlen dieser Substanzen im strömenden Blut noch nicht ableiten, da ihre immunologische Nachweisgrenze in dem Konzentrationsbereich zwischen 1 und 2 mg% liegt. Einer Arbeit von NUSSENZWEIG, SELIGMANN und GRABAR (1961) ist jedoch ein weiteres gewichtiges Argument gegen eine nennenswerte phyiologische in-vivo-Fibrinolyse zu entnehmen. Die Autoren immunisierten Maulesel mit menschlichem Serum und erhielten ein Antiserum, welches bei der Immunoelektrophorese in normalem Humanserum 25 verschiedene Fraktionen anzeigte, mit den isolierten fibrinolytischen Spaltprodukten hingegen nicht reagierte. Aus dieser Beobachtung kann der Schluß gezogen werden, daß in dem zur Immunisierung verwendeten Humanserum keine zu einer Antigenwirkung ausreichenden Spaltproduktmengen enthalten waren. So bleibt festzustellen, daß sich mit den hochempfindlichen immunologischen Untersuchungsmethoden kein Anhalt für das Bestehen einer physiologischen Plasminaktivität im strömenden Blut gewinnen läßt.

Die im Widerspruch zu den eigenen Befunden stehenden Angaben in der Literatur über das Vorhandensein fibrinolytischer Spaltprodukte in frischen Normalseren halten einer Kritik nicht stand. Zunächst ist der

allgemeine Einwand zu erheben, daß in diesen Arbeiten bei der Blutentnahme nicht für eine Ausschaltung der in-vitro-Fibrinolyse gesorgt wurde, so daß sich die Spaltprodukte erst nach der Gerinnung gebildet haben könnten. Eine noch bedeutsamere Fehlerquelle dürfte jedoch die Verwendung unzureichend gereinigter Antiseren darstellen, nachdem sich gezeigt hat, daß das Antifibrinogenserum der Behringwerke nicht monospezifisch ist, sondern einen weiteren Antikörper enthält, der ein mit dem Fibrinogen immunologisch nicht verwandtes, im Plasma und Serum vorhandenes Protein präzipitiert. Nach erschöpfender Absorption dieses nicht fibrinogenspezifischen Antikörpers mittels Humanserum ließen sich die Befunde von SCHULTZE und SCHWICK (1958), die mit dem Antifibrinogenserum der Behringwerke bei der quantitativen optischen Messung in frisch thrombindefibrinierten Plasmen regelmäßig zwischen 27 und 44 mg% fibrinolytische Spaltprodukte gefunden haben, nicht reproduzieren. Von diesen Autoren wurden demnach sicher keine Fibrinogenderivate, sondern die Reaktionsprodukte des nicht fibrinogenspezifischen Antikörpers erfaßt. Bei der Reinheitsprüfung von Antifibrinogenseren ist nach den eigenen Erfahrungen stets zu berücksichtigen, daß sich der am schwierigsten zu entfernende nicht fibrinogenspezifische Antikörper immunoelektrophoretisch häufig nicht überzeugend nachweisen läßt, so daß als Ergänzung die Durchführung eines Doppeldiffusionstestes erforderlich ist, mit dem die Analyse einwandfrei gelingt. SELIGMANN (1958) fand mit einem Antifibrinogenserum, dessen Monospezifität nicht mit dieser empfindlichen Methode gesichert wurde, in frischen Seren, eine schwache Spaltproduktpräzipitation. Seine Befunde dürften sich ebenfalls entweder mit einer unzureichenden Absorption des Antiserums oder mit einer in-vitro-Fibrinolyse erklären lassen. SALMON (1961) gelangte durch Absorptionsstudien zu der Annahme, daß in normalen Seren und damit auch im strömenden Blut fibrinolytische Abbauprodukte

enthalten seien. Er behandelte ein monospezifisches Antifibrinogenserum, das in der Immunoelektrophorese mit Fibrinlysat die beiden typischen Präzipitatlinien ergab, mit Humanserum und beobachtete, daß danach nur noch die zur Kathode hin gelegene Spaltproduktbande in Erscheinung trat. Daraus folgerte er, daß die anodisch wandernde Lysatfraktion ein Bestandteil des normalen Serums sei und den entsprechenden Antikörper erschöpft habe. Die Befunde SALMON's konnten jedoch in den vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden. Niemals kam es bei den wiederholten Absorptionen mit Humanserum, die zur Reinigung der Antifibrinogenseren erforderlich waren, zu einer Erschöpfung der fibrinogenspezifischen Antikörper. Wohl ließ die Intensität der Fibrinogenbanden etwas nach, wenn das Antiserum bei dem Absorptionsvorgang stärker verdünnt wurde, doch waren auch dann beide Spaltproduktlinien immer noch deutlich darzustellen und erlangten ihre ursprüngliche Dichte zurück, wenn das Antiserum mittels Ultrafiltration aufkonzentriert wurde. Die Beobachtung SALMON's kann nur so gedeutet werden, daß sein Antifibrinogenserum mit der anodischen Lysatfraktion von vornherein schwach reagierte, so daß diese Präzipitatlinie bei der Verdünnung des Antiserums mit Humanserum zum Verschwinden gebracht wurde.

Die Ergebnisse von TORETTA und PALADINI (1961) stehen dagegen mit den eigenen Resultaten in Einklang. Um den Übergang der Fibrinogenantikörper auf den Foeten zu studieren, immunisierten die Autoren trächtige Kaninchen mit COHN'scher Fraktion I. Danach erhielten sie von den Mutter- und den Jungtieren Antifibrinogenseren, die nach Absorption mit Humanserum nur noch im Plasma und in der COHN'schen Fraktion I das Fibrinogen präzipitierten, mit Humanserum jedoch keine Reaktion zeigten.

Durch die exakte Reinigung der Antifibrinogenseren und die Ausschaltung der in-vitro-Fibrinolyse mittels epsilon-Aminocapronsäure oder

Trasylol ist die immunologische Methode des Spaltproduktnachweises nunmehr für die praktische Fibrinolyseforschung nutzbar gemacht worden. Ihre Bedeutung liegt darin, daß sie durch die direkte Erfassung des gespaltenen Substrats erstmals eine genaue Untersuchung der intravasalen Fibrinolyse ermöglicht. Bisher war man darauf angewiesen, aus der unter in-vitro-Bedingungen mit verschiedenen Methoden gemessenen Spontanfibrinolyse auf die Verhältnisse im strömenden Blut zu schließen und mußte viele Unsicherheiten in Kauf nehmen, da sich der native Zustand des fibrinolytischen Systems nach der Entnahme des Blutes durch die Gerinnung oder den Zusatz von Antikoagulantien verändert. Nach STAMM (1962), der die Problematik der Bestimmungsmethoden in seiner Monographie eingehend erörtert, bewährt sich noch am besten die Testung der Spontanfibrinolyse am Eigenfibrinsubstrat. Aber auch dieses Verfahren sagt nichts Sicheres über den Grad der Plasminaktivität im strömenden Blut aus, da die Reaktionsbedingungen für die Aktivatoren des fribrinolytischen Systems innerhalb des Gerinnsels günstiger sind als im flüssigen Blut. Zugaben von Fremdsubstrat und alle Maßnahmen zur Aktivierung der potentiellen Fibrinolyse zwecks Verbesserung der Nachweismöglichkeiten erschweren die Deutung der Ergebnisse noch mehr. Eine starke intravasale Fibrinolyse ist selbstverständlich auch mit den bisherigen Methoden eindeutig zu erfassen, am einfachsten durch Bestimmung des Fibrinogens. Ein Beispiel dafür ist die durch Streptokinaseinfusionen induzierte Fibrinolyse, die am Abfall der Fibrinogenkonzentration gut verfolgt werden kann. Zur Diagnostik der klinisch latent bleibenden Spontanfibrinolyse geringeren Grades fehlten dagegen bisher verläßliche Methoden. Nachdem die vorstehenden Untersuchungen gezeigt haben, daß die immunologische Spaltproduktbestimmung nicht nur streng spezifisch, sondern mit einer Nachweisgrenze von etwa 2 mg% gespaltenem Fibrinogen auch äußerst empfindlich ist, dürfte sie die hier vorhandene Lücke in der Methodik schließen. In der vorliegenden Arbeit wurde die praktische Brauchbarkeit bereits am Beispiel von drei mit Streptokinase behandelten Patienten und bei einem Patienten mit schwacher Spontanfibrinolyse demon-

striert. Da normales Serum keine fibrinolytischen Spaltprodukte enthält, bedeutet eine Präzipitatlinie im OUCHTERLONY-Test bereits einen pathologischen Befund. Man kann sich zunächst mit dieser Suchmethode begnügen und dann immer noch im Bedarfsfall die quantitative Bestimmung durch eine Verdünnungsreihe auf OUCHTERLONY-Platten oder mit dem optischen Verfahren anschließen. Vergleichende Untersuchungen ergaben, daß der immunologische Test dem Spaltproduktnachweis durch die Thrombinzeitbestimmung an Spezifität und Empfindlichkeit erheblich überlegen ist. Zur Erfassung einer starken Fibrinolyse und zur Ergänzung der Überwachung der Streptokinasetherapie ist die Thrombinzeitbestimmung jedoch brauchbar, zumal sie sich einfach und schneller als der immunologische Test durchführen läßt. Es empfiehlt sich jedoch zur Vermeidung von fehlerhaften Ergebnissen, auch in dem zur Thrombinzeitbestimmung vorgesehenen Blut sofort bei der Entnahme durch einen Zusatz von Trasylol die in-vitro-Fibrinolyse auszuschalten.

V. Zusammenfassung

1. Durch Immunisierung von Kaninchen mit Humanfibrinogen und Absorption der gewonnenen Seren mit Humanserum wurden streng monospezifische Antifibrinogenseren hergestellt. Diese Seren präzipitierten im OUCHTERLONY-Test, in der Immunoelektrophorese und im optischen Test sowohl Fibrinogen als auch die beiden hochmolekularen Spaltprodukte, die unter Plasmineinwirkung aus Fibrinogen und Fibrin entstehen.

2. In den Seren von 20 gesunden Personen konnten mit der immunologischen Technik keine fibrinolytischen Spaltprodukte nachgewiesen werden, wenn das Blut zur Ausschaltung der in-vitro-Fibrinolyse im Moment der Entnahme mit den Plasminogen- und Plasmininhibitoren Trasylol oder epsilon-Aminocapronsäure versetzt wurde. Da die Nachweisgrenze für die Spaltprodukte mit dem verwendeten Antifibrinogen-

serum bei einer Konzentration von 2 mg% lag, bedeutet dieser Befund, daß eine nennenswerte physiologische Plasminaktivität im strömenden Blut nicht besteht.

3. In den Seren von drei Patienten, die Streptokinaseinfusionen erhalten hatten und bei einem Kranken mit mäßig ausgeprägter Spontanfibrinolyse bei metastasierendem Prostatacarcinom, ließen sich dagegen mit der immunologischen Methodik eindeutig Spaltprodukte erfassen und mit befriedigender Genauigkeit quantitativ bestimmen.

4. Vergleichende Untersuchungen in vitro ergaben, daß der immunologische Test dem Spaltproduktnachweis durch die Thrombinzeitbestimmung an Spezifität und Empfindlichkeit erheblich überlegen ist.

5. Durch die exakte Reinigung der Antifibrinogenseren und die Ausschaltung der störenden in-vitro-Fibrinolyse ist die immunologische Methode der Spaltproduktbestimmung für die praktische Anwendung nutzbar gemacht worden. Sie eignet sich insbesondere für die Untersuchung der intravasalen Spontanfibrinolyse, die mit den bisherigen Methoden nur unvollkommen beurteilt werden konnte.

VI. Literaturverzeichnis

ALKJAERSIG, N., FLETCHER, A.P. and SHERRY, S.: epsilon- Aminocaproic Acid: an inhibitor of Plasminogen activation. J. Biol. Chem. 234, 832 (1959).

ALKJAERSIG, N., FLETCHER, A.P. and SHERRY, S.: Pathogenesis of the coagulation defect developing during pathological plasma proteolytic ("fibrinolytic") states. II The significance, mechanism and consequences of defective fibrin polymerisation. J. Clin. Invest. 41, 917 (1962).

FLETCHER, A.P., ALKJAERSIG, N. and SHERRY, S.: Pathogenesis of the coagulation defect developing during pathological plasma proteolytic ("fibrinolytic") states. I. The significance of fibrinogen proteolysis and circulating fibrinogen breakdown products. J. Clin. Invest. 41, 896 (1962).

GRABAR, P. et WILLIAMS, C.A. jr.: Méthode permettant l'étude conjugée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange des protéines. Biochim. Biophys. Acta 10, 193 (1953).

HENNING, N.: Klinische Laboratoriumsdiagnostik. Urban & Schwarzenberg, München und Berlin 1962, Seite 11.

HJORT, P.E. and HASSELBACK, R.: A critical review of the evidence for a contineous hemostasis in vivo. Thromb. Diath. Haemorrh. 6, 580 (1961).

JÜRGENS, J.: Über das Verhalten antithrombischer Substanzen bei Erkrankungen der Leber. Dtsch. Arch. klin. Med. 200, 67 (1952).

KAPLAN, E.H.: Action of fibrinolysin (plasmin) on proteins Proc. Soc. exp. Biol. Med. 85, 142 (1954).

LA TORETTA, G., PALADINI, A.: Potere antigene del fibrinogeno.
Nota I: Specificità degli anticorpi antifibringeno. Arch. Ost. Gin. 66, 396 (1961).
Nota II: Passaggio transplacentare di anticorpi antifibrinogeno. Arch. Ost. Gin. 66, 403 (1961).

MARX, R., CLEMENTE, P., WERLE, E. u. APPEL, W.: Zum Problem eines Antidotes in der internen Thrombotherapie mit Fibrinolytika. - Blut 5, 367 (1959).

NIEWIAROWSKI, S. and KOWALSKI, E.: Antithrombin formation during proteolysis of fibrinogen transactions of the 6th Congress of the European Society of Hematology. Copenhagen, 1957, Karger.

NIEWIAROWSKI, S. et KOWALSKI, E.: Un nouvel anticoagulant dérivé du fibrinogène. Rev. Hémat. 13, 320 (1958).

NUSSENZWEIG, V. et SELIGMANN, M.: Analyse, par des méthodes immunochimiques, de la degradation par la plasmine du fibrinogène humain et de la fibrine, a différents stades. Rev. Hémat. 15, 451 (1960).

NUSSENZWEIG, V., SELIGMANN, M., PELMONT, J. et GRABAR, P.: Les produits de degradation du fibrinogène humain par la plasmine. I. - Separation et propriétés physicochimiques. Ann. Inst. Pasteur 100, 377 (1961).

NUSSENZWEIG, V., SELIGMANN, M et GRABAR, P.: Les produits de degradation du fibrinogène humain par la plasmine. II. - Étude immunologique: Mise en évidence d'anticorps anti-fibrinogène natif possédant des spécificités différents. Ann. Inst. Pasteur 100, 490 (1961).

OUCHTERLONY, O.: Diffusion - in - gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy 5, 1 (1958).

SALMON, J.: Études immunochimiques du fibrinogène humain et de ses dérivés. Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol. 4, 51 (1959).

SALMON, J.: Études immunochimiques du fibrinogène et de ses dérivés. Clin. Chim. Acta 4, 767 (1959).

SALMON, J.: Mise en évidence de produits de fibrinolyse ou de fibrinogénolyse dans le sang humain normal. C. R. Soc. Biol. (Par.) 155, 1154 (1961).

SALMON, J.: Étude immunochimique de la fibrinolyse et de la fibrinogènolyse. Protides of the Biological Fluids. 9th Colloqu. 1961. Elsevier Publ. Co.: Amsterdam - New York, 1962.

SCHULTZE, H.E. und SCHWICK, G.: Immunchemischer Nachweis von Proteinveränderungen unter besonderer Berücksichtigung fermentativer Einwirkungen auf Glyko- und Lipoproteine. Immunelektrophoretische Studien. Behringwerk-Mitteilungen, Heft 33, 11 (1957).

SCHULTZE, H.E. und SCHWICK, G.: Quantitative immunologische Bestimmung der Plasmaproteine. Behringwerk-Mitteilungen, Heft 35, 57 (1958).

SCHULTZE, H.E. und SCHWICK, G: Quantitative immunologische Bestimmung von Plasmaproteinen. Protides of the Biological Fluids. Proc. of the VI. Colloqu. 1958, Elsevier Publ. Co., Amsterdam.

SEEGERS, W.A., NIEFT, N. and VANDENBELT, J.M.: Décomposition products of fibrinogen and fribrin. Arch. Biochem. Biphys. 7, 15 (1945).

SELIGMANN, M.: Possibilité d'étude immunochimique de la fibrinolyse. Rev. Franc. Études Clin. et Biol. 3, 1073 (1958).

STAMM, H.: Einführung in die Klinik der Fibrinolyse. S. Karger, Basel, New York 1962.

STREICHELE, D.F. und HERSCHLEIN, H.J.: Zur antifibrinolytischen Wirkung des Trypsin-Kallikrein-Inaktivators. Med. Welt Nr. 42, 2170) (1961).

WYCOFF, H.D.: A microassay for plasma fibrinogen. J. Lab. Clin. Med. 47, 645 (1956).

Für die Überlassung des Themas möchte ich Herrn Professor Dr. G. Schettler danken.

Außerdem gilt mein Dank für die Anleitung und Beratung Herrn Dr. W. Piper.

Lebenslauf

Am 15. November 1936 wurde ich in Nordhausen am Harz als Sohn des Nervenarztes Dr. Paul Krüger und seiner Ehefrau Hertha, geb. Flöricke, geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule in Torgau/Elbe, Sangerhausen und Nordhausen und der Humboldt-Oberschule in Nordhausen bestand ich am 28. 6. 1954 das Abitur. Am 20. 8. 1955 erhielt ich in Berlin-West nach Absolvierung des 13. Schuljahres die Anerkennung meines Reifezeugnisses der sowjetischen Besatzungszone.

Im Jahre 1955 begann ich mit dem Studium an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin, wo ich die ärztliche Vorprüfung und das Staatsexamen am 5. April 1962 ablegte. Vom 1. Juli 1962 bis 30. April 1963 war ich als Medizinalassistent an der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik (Prof. Dr. G. Schettler) beschäftigt.

Photodruck der Photo Copie GmbH.